

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



| | | |
|---|-----------|---|
| (51) 国際特許分類7 G01N 33/92, C12Q 1/44 | A1 | (11) 国際公開番号 WO00/52480 (43) 国際公開日 2000年9月8日(08.09.00) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP00/01172 (22) 国際出願日 2000年2月29日(29.02.00) (30) 優先権データ 特願平11/53330 1999年3月1日(01.03.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 国際試薬株式会社 (INTERNATIONAL REAGENTS CORPORATION)[JP/JP] 〒651-0083 兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号 Hyogo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 岸 浩司(KISHI, Koji)[JP/JP] 角山 功(KAKUYAMA, Tsutomu)[JP/JP] 落合浩二(OCHIAI, Koji)[JP/JP] 長谷川有三(HASEGAWA, Yuzo)[JP/JP] 〒651-2241 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1番2号 国際試薬株式会社 研究開発センター内 Hyogo, (JP) | | (74) 代理人 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.) 〒101-0032 東京都千代田区岩本町3丁目9番9号 第一瀬野ビル1階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書 |
| (54) Title: METHOD FOR ASSAYING BIOLOGICAL SAMPLE COMPONENT (54) 発明の名称 生体試料成分の測定方法 (57) Abstract A method for quantitating a specific component in lipoproteins contained in a biological sample, for example, HDL (high-density lipoprotein), LDL (low-density lipoprotein) or VLDL (very low-density lipoprotein) by using a commonly employed automatic analyzer without centrifuging or making the reaction liquor cloudy due to complexes or aggregates. Namely, a controlling means, whereby an enzyme reaction can be carried out exclusively for the target component, is introduced into a method for enzymatically assaying a component in a specific lipoprotein fraction in the serum, thereby specifically assaying the component. | | |

汎用の自動分析装置を用いて、遠心分離をすることなく、また、反応液中に複合体や凝集体による濁りを形成することなく、生体試料中のHDL（高比重リポ蛋白）、LDL（低比重リポ蛋白）、VLDL（超低比重リポ蛋白）等のリポ蛋白中の特定の成分を定量する方法を提供することを、血清中の特定リポ蛋白画分中の成分を酵素反応で測定する方法において、特異的に該成分を測定するために、特定リポ蛋白画分の測定目的の成分に対してのみ酵素反応を可能にする調整手段を導入することにより達成した。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | |
|-----------------|------------|-------------------|---------------|
| AE アラブ首長国連邦 | DM ドミニカ | KZ カザフスタン | RU ロシア |
| AG アンティグア・バーブーダ | DZ アルジェリア | LC セントルシア | SD スーダン |
| AL アルバニア | EE エストニア | LI リヒテンシュタイン | SE スウェーデン |
| AM アルメニア | ES スペイン | LK スリ・ランカ | SG シンガポール |
| AT オーストリア | FI フィンランド | LR リベリア | SI スロヴェニア |
| AU オーストラリア | FR フランス | LS レソト | SK スロヴァキア |
| AZ アゼルバイジャン | GA ガボン | LT リトアニア | SL シェラ・レオネ |
| BA ボスニア・ヘルツェゴビナ | GB 英国 | LU ルクセンブルグ | SN セネガル |
| BB バルバドス | GD グレナダ | LV ラトヴィア | SZ スワジランド |
| BE ベルギー | GE グルジア | MA モロッコ | TD チャード |
| BF ブルキナ・ファソ | GH ガーナ | MC モナコ | TG トーゴ |
| BG ブルガリア | GM ガンビア | MD モルドヴァ | TJ タジキスタン |
| BJ ベナン | GN ギニア | MG マダガスカル | TM トルクメニスタン |
| BR ブラジル | GR ギリシャ | MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア | TR トルコ |
| BY ベラルーシ | GW キニア・ビサオ | 共和国 | TT トリニダード・トバゴ |
| CA カナダ | HR クロアチア | マリ | TZ タンザニア |
| CF 中央アフリカ | HU ハンガリー | ML モンゴル | UA ウクライナ |
| CG コンゴ | ID インドネシア | MN モーリタニア | UG ウガンダ |
| CH スイス | IE アイルランド | MR マラウイ | US 米国 |
| CI コートジボアール | IL イスラエル | MW メキシコ | UZ ウズベキスタン |
| CM カメルーン | IN インド | MX メキシコ | VN ヴェトナム |
| CN 中国 | IS アイスランド | MZ モザンビーク | YU ユーゴスラヴィア |
| CR コスタ・リカ | IT イタリア | NE ニジェール | ZA 南アフリカ共和国 |
| CU キューバ | JP 日本 | NL オランダ | ZW ジンバブエ |
| CY キプロス | KE ケニア | NO ノールウェー | |
| CZ チェッコ | KG キルギスタン | NZ ニュー・ジーランド | |
| DE ドイツ | KP 北朝鮮 | PL ポーランド | |
| DK デンマーク | KR 韓国 | PT ポルトガル | |
| | | RO ルーマニア | |

明細書

生体試料成分の測定方法

技術分野

- 5 本発明は、血清中の特定のリポ蛋白画分中の成分を酵素反応によって測定する手段および方法に関するものである。

背景技術

- 古くからリポ蛋白は、超遠心操作により高比重リポ蛋白 (HDL)、低
10 比重リポ蛋白 (LDL)、超低比重リポ蛋白 (VLDL)、カイロミクロン (CM) に分画されていた。この操作は熟練が必要であり、超遠心機を備え付け、遠心を数日にわたって行う。そのため、多検体を処理することは出来なかった。

- これに代わりポリエチレングリコール、またはデキストラン硫酸等の
15 ポリアニオンに、マグネシウムやカルシウム等の二価カチオンを共存させたり、リンタングステン酸に二価カチオンを共存させた溶液と血清とを混和させて LDL、VLDL、CM を沈澱させ、遠心後の上清に残る HDL のみを分画する方法が主流となっていた。

- この方法は、臨床検査の分野で広く普及している自動分析装置を用い
20 ることができる。すなわち分画した HDL 中のコレステロールは、既に確立されている自動分析装置を用いた総コレステロールの酵素法による測定を応用して、その濃度を求めることができる。しかしながらこの方法も低速ではあるが遠心操作が必要であり、分画剤と血清を混和させる
25 の上、自動分析装置で他の一般的な生化学項目と同時に測定出来なかった。臨床検査は迅速な対応が求められており、他の検査項目と同時に測定して検査時間を短縮することが課題となっていた。

一方、臨床的に動脈硬化のリスクファクターであるLDL中のコレステロール値を重視する報告〔総コレステロールの基準値と設定根拠：動脈硬化，24(6)，280(1996)〕もある。現在LDL中のコレステロール値は総コレステロール(T-CHO)、中性脂肪(TG)およびHDL中コレステロールの測定結果から、経験的なファクターを挿入して求める。その式[Friedewald W. T., et al., Clin. Chem., 18, 499~502(1972)]は以下である。

10

LDL中コレステロール値＝

$$\text{総コレステロール値} - \text{HDLコレステロール値} - \text{TG値} / 5$$

この方法は、測定する3項目が全て正確に測定されなければ成立しない。また、TG値が400mg/dLを越えたり、LDL中のコレステロール濃度が100mg/dL以下になると、計算値がLDL中のコレステロール濃度を反映しなくなると言われている[Warnick G. R., et al., Clin. Chem., 36(1), 15~19(1990)], [McNamara J. R., et al., Clin. Chem., 36(1), 36~42(1990)]。従って、この方法では測定

20 あるLDL中のコレステロールの異常値を検出することが難しかった。

また他に、電気泳動でリポ蛋白を分離し蛋白量を測定する方法や、HPLCによるリポ蛋白別コレステロールの測定法もあるが、いずれも検体処理能力に欠ける方法であり、高価な専用装置も必要となる。

近年、HDL中のコレステロール測定に関して前述した問題を解決するため、HDL中のコレステロールを全自動で測定するキットが開発され普及しつつある。特許第2600065号公報、特開平8-201393号公報および特開平8-131195号公報にみられる技術は、分

25

画剤を併用しており、分画剤に含まれる二価カチオンとして用いられる金属が、自動分析装置で一般的に使用される洗剤により不溶性の沈殿物を形成し、それが該装置の廃液機構内で蓄積することにより、故障の原因となっている。

- 5 更に、測定反応中に不溶性の凝集物を形成し、測定結果に影響を与える濁りが生じて測定誤差の原因となっているばかりか、その凝集物により反応セルが汚染され、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与えている。

- このHDL中のコレステロールの自動測定法では、2ポイントエンド
10 法、レート法、ダブルレート法、フィックスタイム法などの公知の測光法が選択できるようになっているので、濁ったままの状態でも測定は可能である。しかし、これらの測光法によってもこの濁りの中における測定は、反応中に濁度変化があったときは、測定値の正確性に問題が生ずる。また、反応液が濁ると再現性が低下する。それ故、測定する検体に
15 制限が加わり、幅広い測定波長を用いることができず、多種多様な患者検体に対応することができない。例えば、340nm付近（短波長域）では凝集物による濁りの現象で吸光度が2～3以上となり分析機の許容範囲をしばしば越えてしまう欠点がある。

- 二価カチオンを用いることのない特開平9-96637号公報記載の
20 技術は、リボ蛋白と凝集する抗血清とを含ませる方法であるが、これも濁りの原因となる抗原抗体凝集物を形成するので、反応セルが汚染される。従って、同時に測定している他の生化学項目の測定結果に少なからず影響を与える。また、反応液中の濁りが強くなるので、特に短波長域によるHDL中のコレステロール測定に対しても前述と同じ原因で正確
25 な測定が不可能である。

これらの技術は、複合体や凝集体を形成することで、酵素反応を阻害する共通の技術と測光法を工夫することで成り立っているものであり、

濁り本来が持つ測定への悪影響は、解消されない。このような濁りを最終的に消去する技術が濁り対策の一つである。特開平 6-242110 号公報に見られるように、濁りを最終的に消去する操作を加えれば、正確な測定値が得られるようになる。しかし、この方法では最低でも 3 ~ 4 段階の試薬分注操作が必要となる。市販されている自動分析装置の中には 3 ~ 4 段階の試薬分注操作に対応できるものもあるが、一般的に普及している生化学項目用の自動分析装置は最大 2 段階の試薬分注操作に対応しているものが多いので、この方法が応用できないことがあった。

一方、LDL 中のコレステロールの測定は、現在も前述したような計算による方法を取らざるを得ない状況である。近年、特開平 07-280812 号公報、WO 96/29599 号公報、特開平 09-313200 号公報記載の技術に見られる、完全自動化を目指した LDL 中のコレステロール測定法の報告がある。これらは、凝集体や複合体を形成する技術の延長線上にあるので、測定時の濁りの調整が今後の課題である。

15

発明の開示

本発明が解決しようとする課題は、血清中の特定のリポ蛋白画分中の成分を酵素反応によって測定する方法において、汎用の自動分析装置を用いて、処理工程中に遠心分離操作をすることなく、また、反応液中に複合体や凝集体による濁りを形成することなく、生体試料中の HDL (高比重リポ蛋白)、LDL (低比重リポ蛋白)、VLDL (超低比重リポ蛋白) 等のリポ蛋白中の成分を定量する方法を提供することである。

本発明は、血清中の特定リポ蛋白画分中の成分を酵素反応で測定する方法において、特異的に該成分を測定するために、リポ蛋白画分の成分に作用する酵素の反応性を調整する手段を導入することを特徴とする、特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法を提供する。特定のリポ蛋白画分の成分に作用する酵素の反応性を調整する手段としては、酵素反応液の

25

イオン強度を調整する物質を添加すること、非イオン界面活性剤を選択すること、および／または特定リポ蛋白に対する反応特異性を有する酵素を選択し用いること、が挙げられる。

本発明は、上記3つの手段を適宜選択し、単独であるいは組合せて利用することにより、HDL中の成分の測定法、LDL中の成分の測定法、および／またはVLDL中の成分の測定方法を提供する。

本発明の測定方法は、高比重リポ蛋白（HDL）中の成分を測定する場合、反応液のイオン強度を十分に高くすること、および／またはHDLに優先的に作用するリポプロテインリパーゼおよび／またはコレステロールエステラーゼを作用させること、および／またはHDLに反応選択性をもちHLB値が16以上である非イオン界面活性剤を使用すること、を導入することを特徴とする。

さらに本発明の測定方法は、低比重リポ蛋白（LDL）中のコレステロールを測定する場合、第一酵素反応系においてまずHDL画分中のコレステロール成分を選択的に酵素反応させて測定または消化し、ついで第二酵素反応系においてHLB値が11～13である非イオン界面活性剤を利用してLDL画分中のコレステロール成分を酵素反応により測定する方法を提供する。

さらにまた本発明の測定方法は、第一酵素反応系および第二酵素反応系を同時にまたは別々に行うことにより超低比重リポ蛋白（VLDL）中のコレステロール成分を残留させ、ついでVLDL画分を分解する手段を導入してVLDL画分中のコレステロール成分を酵素反応により測定する方法を提供する。また、HDL、LDLの消去を伴わず、VLDL画分中のコレステロールを測定してもよい。

また本発明の測定方法は、上記本発明の測定方法にコレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を添加して遊離のコレステロールを消化する工程を加えた測定方法をも含む。

上記本発明の測定方法は、その酵素反応液のpHが、リボ蛋白が凝集、または白濁を起こさない範囲であって、リボ蛋白中の成分を酵素反応させる酵素の至適pHにより選択されることを特徴とする。

5 図面の説明

図1：リボプロテインリパーゼ(LPL;chromobacterium viscosum由来)の添加効果を示した図である。(実験1) 図中、—●—はHDL画分、—○—はLDL画分、—□—はVLDL画分の反応相対量(%)を示す。

図2：ヒドラジンの添加効果を示した図である。(実験2) 図中、—●—はHDL画分、—○—はLDL画分、—□—はVLDL画分の反応相対量(%)を示す。

図3：HLB値が17.3である非イオン界面活性剤ノニオンK-230の添加効果を示した図である。(実験3) 図中、—●—はHDL画分、—○—はLDL画分、—□—はVLDL画分の反応相対量(%)を示す。

図4：酵素反応液のイオン強度調整物質、非イオン界面活性剤ノニオンK-230、および選択された酵素を添加した効果を示した図である。(実験4) 図中、—●—はHDL画分、—○—はLDL画分、—□—はVLDL画分の反応相対量(%)を示す。

20 発明の実施の最良の形態

本発明の酵素反応液のイオン強度を調整する物質を添加することによる特定リボ蛋白成分に対する酵素の反応性を調整することとは、HDL、LDL、VLDLの各リボ蛋白画分が水溶解性において差異をもつことから、この性質を利用して特定画分のみを溶解させ、選択的に特定画分中の成分に対して酵素反応を起こすことを意味する。この目的を達成する一手段として、試料中のイオン強度を上昇させる。HDLを選択的に溶解させるためのイオン強度は、例えばヒドラジン濃度において約30

mM、より好ましくは60 mM以上を添加することによって得られる。ヒドラジンとしては、ヒドラジン類、その塩、その水和物、その溶媒和物から、HDLの選択溶解性を指標にして選ばれたものが、使用できる。同様に、NaCl、尿素、グアニジン類、セミカルバジド類も、使用できる。イオン強度を上昇させるこれらの化合物は、単独でまたは複数を組み合わせて使用してもよい。これらの使用濃度は、HDLの選択溶解性を指標にして、用時実験的繰返しによって、決定できる。

本発明の、酵素の特定リボ蛋白に対する反応特異性を利用して特定リボ蛋白画分の成分に対して直接のおよび／または優先的に反応液中で酵素反応を可能とする手段は、HDL画分に優先的に作用するリボプロテインリパーゼ(LPL)および／またはコレステロールエステラーゼ(CE)を選択して行う。この酵素としては、市販の*Chromobacterium viscosum*由来のLPL、CEが例示される。なお、LDL画分を対象にする場合には、*Pseudomonas*属由来の酵素などを適宜選択することができる。酵素について、各種修飾化は、酵素活性と特定リボ蛋白画分への選択性が維持されていれば、為されても為されなくてもよい。酵素の添加量は、自体公知の基質量に応じて増減され調整される。

本発明の、選択された非イオン界面活性剤の特定リボ蛋白に対する反応選択性を利用して、特定リボ蛋白画分の成分に対して直接のおよび／または優先的に反応液中で酵素反応を可能とする手段は、非イオン界面活性剤のHLB値によって特定される。

HDL画分を対象にする場合、HLB値が16以上のものが選択され、好適には17以上が選択される。より好ましくは、HLB値が17以上のポリオキシエチレンエーテル類が選択される。この選択された界面活性剤は、LDL画分及びVLDL画分に対するLPL、CE、コレステロール脱水素酵素(CDH)等の酵素作用を阻害する。具体例を以下に

列記するが、本発明に用いる非イオン界面活性剤は、HLB値を指標にして随時選択可能であり、下記の例に限定されない；セチルエーテル（C 16）（ヘキサデシルエーテル）（商品名：日光ケミカル株式会社：BC-25TX、BC-30TX、BC-40TX）、ラウリルエーテル（C 12）（ドデシルエーテル）（商品名：日光ケミカル株式会社：BL-21、BL-25）、オレイルエーテル（商品名：日光ケミカル株式会社：BO-50）、ベヘニルエーテル（C 22）（商品名：日光ケミカル株式会社：BB-30）、ポリオキシエチレンラウリルエーテル（商品名：日本油脂株式会社：ノニオンK-230）、ポリオキシエチレンモノラウレート（商品名：日本油脂株式会社：ノニオンS-40）、ポリオキシエチレンエーテル類（商品名：シグマ：Brij 98、Brij 721、Brij 78、Brij 99）等。

LDL画分またはVLDL画分を対象にする場合、とくに積極的にLDL画分の成分への酵素反応を対象とする場合には、HLB値が11～13の非イオン界面活性剤が選択される。例示をすれば、トリトンX-100、ノニオンHS210、ノニオンA-10R（日本油脂株式会社）があげられる。しかし、LDL画分の成分を測定するため使用する界面活性剤も、HLB値を指標にして随時選択することができ、これらの例に限定されない。

上記界面活性剤の添加量は、測定するリポ蛋白量により変化するが、HDLおよびLDLを対象とした事例において示したのは、検体約5 μ Lに対して、界面活性剤濃度0.01～10%の試薬約180 μ Lである。これにより、HDLまたはLDLが選択的に分解され、これらに含まれる成分の酵素反応が可能となる。VLDLを対象とする場合には、界面活性剤濃度を0.05～20%に調整して使用される。これにより、VLDLが選択的に分解され、これに含まれる成分の酵素反応が可能となる。

酵素反応がなされる反応液のpHは、リポ蛋白が凝集または白濁をおこさない範囲であって、リポ蛋白中の成分に作用する酵素の至適pHを考慮して選択される。好適には、pH約6～約9である。pHが約6以下であると、リポ蛋白が白濁をおこす。リポ蛋白が比較的安定なpH7付近を選択して測定条件を調整すればよいが、COD（コレステロール酸化酵素）、CDH（コレステロール脱水素酵素）、LPL、およびCE等の酵素の至適pHも考慮する。好適には、CDH、LPL、およびCEの反応は、pH約7～約9が望ましく、CODの反応は、pH約6～約8が望ましい。反応液は、緩衝液で調整することが好ましく、通常生化学反応に用いられる各種緩衝液が利用できる。例示すれば、HEPES（2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid）緩衝液、PIPES（Piperazine-1,4'-bis(2-ethanesulfonic acid)）緩衝液、TAPS（N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-3-aminopropanesulfonic acid）緩衝液、BES-BisTris緩衝液、Tris-塩酸緩衝液、3-モルホリノプロパンスルホン酸(MOPS)緩衝液、リン酸緩衝液、を添加物との適合性により適宜選択して利用する。なお、本発明の実施例および実験例では、pH条件に合わせて、各々PIPES緩衝液およびTAPS緩衝液を利用した。

また所望により、LDL、VLDLおよびカイロミクロン中の遊離型コレステロールが、HDL中のコレステロール測定時の反応に関与して、しばしば誤差の原因となるので、予めCODやCDHでこれらの遊離型コレステロールを反応させてヒドラジン存在下で、コレステノンヒドラゾンに変換し、HDL中のコレステロール測定時のために、非基質化しておく方法もある。非基質化する技術は公知であり、例えば特開平5-176797号公報を参考にすればよい。

本発明においては、上記3つの手段、イオン強度の選択、酵素の選択、界面活性剤の選択、を単独でまたは適宜選択し組合せて導入する。より好適にはこれら全ての手段を同時に導入するが、必ずしも全てを同時に導入する必要は無い。

- 5 HDL中のコレステロール成分を測定する場合、第一の要件は、水溶性が高い高比重リポ蛋白(HDL)中の成分を溶液中に溶解しやすくするためにイオン強度を十分な程度に高く調整することであり、第二の要件はHDL画分に優先的に作用するリポプロテインリパーゼ(LPL)および/またはコレステロールエステラーゼ(CE)を選択して作用さ
- 10 せることであり、第三の要件はHDL画分に対して反応選択性をもちHLB値が16以上である非イオン界面活性剤を用いてHDL画分中の成分に対して直接のおよび/または優先的に反応液中で酵素反応をおこすことである。

- リポ蛋白中の成分であるコレステロールを酵素測定法で測定する場合、
- 15 酵素としてCDHを用いるときは補酵素として、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(NAD)、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(t -NAD)、 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸酸化型(NADP)、チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸酸化型(t -NADP)等を使用する。また、CODを
- 20 使用するときには、パーオキシダーゼ(POD)と公知の過酸化水素定量法を組み合わせ測定を行う。総コレステロールの測定に必要となる酵素の活性化剤であるコール酸類や界面活性剤は、その条件を適宜選択し、実験的繰り返しにより濃度を調整すればよい。

- LDL中のコレステロール成分を測定する場合は、まず上記のHDL
- 25 画分中のコレステロール成分を第一酵素反応系において選択的に酵素反応させ、ついで第二酵素反応系においてLDL画分に対して作用するLPLおよび/またはCEとLDLを積極的に分解する界面活性剤とを加

え、CDHによる反応生産物を検出する。

酵素反応生産物の測定は、CE、LPL等の酵素作用によって生成される化合物であるコレステロールを定量する自体公知の方法から適宜に以下に示すような測定系を選択して行う。例えば、CDH-NAD系を用いる場合は340 nmの吸光度で測定し、CDH-t-NAD系を用いる場合は405 nmの吸光度で測定し、COD系を用いる場合、500 nm以上（色原体の種類に依存する）の吸光度で測定する。測光法は、既知のレート法、2ポイントエンド法等が所望により利用できる。

10 実施例

実施例 1

以下の試薬を調製した。検体は、一般人の血清10例を用いた。測定は、日立7170型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず各検体5 μ Lに、試薬1-AまたはBまたはC 180 μ Lをそれぞれ加え37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340 nmおよび副波長570 nmで吸光度1を測定した。更に、試薬2を60 μ L加えて37℃で5分間恒温し、この時点で主波長340 nmおよび副波長570 nmで吸光度2を測定した。吸光度1と吸光度2の差を求めて、HDL-コレステロール濃度が既知のコントロールを標準液として検体の値を換算した。対照法としてポリエチレングリコール（PG）法を用いた。PG法は国際試薬株式会社製PGボールを使用した。また、遠心後の上清のコレステロール濃度は、国際試薬株式会社製T-CHO試薬・Aを用いて求めた。測定結果として対照法との比較を表1に示した。試薬1-A、1-B、1-Cを用いた測定は対照法によく一致した良好な結果となった。

25

試薬 1-A

緩衝液

pH 7.0

| | |
|----------------------|------------|
| 二塩化ヒドラジニウム | 100 mmol/L |
| β -NAD | 6.0 mmol/L |
| コール酸ナトリウム | 0.1% |
| ノニオンK-230 (HLB値17.3) | 0.6% |

5

試薬1-B

| | |
|---------------------|------------|
| 緩衝液 | pH 7.0 |
| 二塩化ヒドラジニウム | 100 mmol/L |
| β -NAD | 6.0 mmol/L |
| 10 Brij 97 (HLB値19) | 0.24% |
| コール酸ナトリウム | 0.1% |

試薬1-C

| | |
|----------------------|------------|
| 緩衝液 | pH 7.0 |
| 15 二塩化ヒドラジニウム | 100 mmol/L |
| β -NAD | 6.0 mmol/L |
| ノニオンK-230 (HLB値17.3) | 0.2% |
| コレステロール酸化酵素 (COD) | 1.0 U/mL |
| コール酸ナトリウム | 0.1% |

20

試薬2

| | |
|---------------------------------|-----------|
| 緩衝液 | pH 8.5 |
| コレステロール脱水素酵素 (CDH) | 20.0 U/mL |
| LPL | 6.0 U/mL |
| 25 (Chromobacterium viscosum由来) | |
| コール酸ナトリウム | 0.2% |

表 1

単位: mg/dL

| 検体 | 対照法 | 試薬 1 - A | 試薬 1 - B | 試薬 1 - C |
|--------|-------|----------|----------|----------|
| 1 | 31.6 | 33.1 | 22.6 | 34.0 |
| 2 | 71.6 | 71.3 | 70.8 | 70.3 |
| 3 | 53.8 | 58.8 | 56.3 | 58.2 |
| 4 | 42.4 | 46.3 | 39.8 | 45.2 |
| 8 | 52.6 | 54.8 | 49.2 | 56.2 |
| 9 | 35.9 | 43.3 | 39.5 | 42.4 |
| 7 | 41.1 | 44.0 | 41.2 | 44.9 |
| 8 | 26.0 | 28.2 | 27.6 | 27.3 |
| 9 | 60.0 | 67.9 | 66.9 | 61.0 |
| 10 | 112.0 | 119.6 | 121.1 | 119.7 |
| 相関関係 | | 0.995 | 0.989 | 0.995 |
| 回帰式の傾き | | 1.039 | 1.123 | 1.031 |
| 回帰式の切片 | | 1.968 | -5.695 | 1.569 |

5 実施例 2

- 以下の試薬を調製した。検体は、一般人の血清 10 例を用いた。測定は、日立 7170 型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず検体 3 μ L に試薬 A-1 を 210 μ L 加え 37°C で 5 分間恒温し、この時点で主波長 340 nm および副波長 570 nm で吸光度 1 を測定した。更に、
- 10 試薬 A-2 を 70 μ L 加え 37°C で 5 分間恒温し、この時点で主波長 340 nm および副波長 570 nm で吸光度 2 を測定した。吸光度 1 と吸光度 2 の差を求めて LDL-コレステロール濃度が既知のコントロールを標準液として検体の値を換算した。試薬 B-1 と試薬 B-2 も前述と同様に操作する。対照法の値は、フリーデワルド式より求めた。HDL
- 15 コレステロール値は、国際試薬株式会社製 PG ボールを使用した。総コレステロール値は、国際試薬株式会社製 T-CHO 試薬・A を用いて求めた。TG 値は、国際試薬株式会社製 TG 試薬・A を用いて求めた。測定結果を表 2 に示した。本法は、対照法と比べて良好な結果を得た。

試薬A-1

| | | |
|----|------------------------------|------------|
| | 緩衝液 | pH 7.8 |
| | 二塩化ヒドラジニウム | 100 mmol/L |
| 5 | コレステロール脱水素酵素 (CDH) | 20.0 U/mL |
| | β -NAD | 6.0 mmol/L |
| | LPL | 6.0 U/mL |
| | (Chromobacterium viscosum由来) | |
| | ノニオンK-230 (HLB値17.3) | 0.15% |
| 10 | コール酸ナトリウム | 0.1% |

試薬A-2

| | | |
|----|--------------------|------------|
| | 緩衝液 | pH 8.5 |
| | CE (Pseudomonas由来) | 3.0 U/mL |
| 15 | ノニオンA-10R | 0.5% |
| | デオキシコール酸ナトリウム | 8.0 mmol/L |

試薬B-1

| | | |
|----|------------------------------|------------|
| | 緩衝液 | pH 7.8 |
| 20 | 二塩化ヒドラジニウム | 100 mmol/L |
| | β -NAD | 5.0 mmol/L |
| | コレステロール酸化酵素 (COD) | 0.3 U/mL |
| | LPL | 6.0 U/mL |
| | (Chromobacterium viscosum由来) | |
| 25 | ノニオンK-230 (HLB値17.3) | 0.15% |
| | コール酸ナトリウム | 0.1% |

試薬 B - 2

緩衝液

pH 8.5

コレステロール脱水素酵素 (CDH)

20.0 U/mL

5 CE

3.0 U/mL

(Pseudomonas 由来)

ノニオン A-10R

0.5%

デオキシコール酸ナトリウム

8.0 mmol/L

10 表 2

単位: mg/dL

| 検体 | 対照法 | 試薬 A | 試薬 B |
|--------|-----|-------|-------|
| 1 | 151 | 155 | 147 |
| 2 | 173 | 188 | 168 |
| 3 | 236 | 234 | 220 |
| 4 | 79 | 79 | 66 |
| 8 | 173 | 167 | 157 |
| 9 | 170 | 173 | 163 |
| 7 | 118 | 123 | 111 |
| 8 | 87 | 93 | 81 |
| 9 | 92 | 95 | 90 |
| 10 | 64 | 72 | 64 |
| 相関関係 | | 0.995 | 0.996 |
| 回帰式の傾き | | 0.973 | 0.943 |
| 回帰式の切片 | | 7.235 | 0.083 |

実験例

以下の試薬を調製し、各ファクターの効果を実験 1～4 で検討した。

- 15 検体は、一般人の血清 10 例をプールしたのち、超遠心操作をしてえられる、HDL、LDL、および VLDL 画分を使用した。測定は、日立 7170 型自動分析装置で実施した。操作法は、先ず各検体 5 μ L に各々 180 μ L の試薬 1-D～G を加え、37℃で 5 分間恒温し、この時点

で主波長 340 nm および副波長 570 nm で吸光度 1 を測定した。更に、試薬 1-D ~ G に各々相応する試薬 2-D ~ G を各 60 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 5 分間恒温し、この時点で主波長 340 nm および副波長 570 nm で吸光度 2 を測定した。吸光度 1 と吸光度 2 の差を検定した。

5

実験 1 のための試薬 1-D と試薬 2-D

試薬 1-D

緩衝液

pH 7.0

β -NAD

6.0 mmol/L

10 コール酸ナトリウム

0.1%

試薬 2-D

緩衝液

pH 8.5

コレステロール脱水素酵素 (CDH)

20.0 U/mL

15 LPL

0 ~ 15 U/mL

(*Chromobacterium viscosum* 由来)

コール酸ナトリウム

0.2%

実験 2 のための試薬 1-E と試薬 2-E

20 試薬 1-E

緩衝液

pH 7.0

二塩化ヒドラジニウム

0 ~ 100 mmol/L

β -NAD

6.0 mmol/L

コール酸ナトリウム

0.1%

25

試薬 2-E

緩衝液

pH 8.5

コレステロール脱水素酵素 (CDH) 20.0 U/mL
LPL 6.0 U/mL
(*Chromobacterium viscosum* 由来)
コール酸ナトリウム 0.2%

5

実験3のための試薬1-Fと試薬2-F

試薬1-F

緩衝液 pH 7.0
 β -NAD 6.0 mmol/L
10 ノニオンK-230 (HLB値17.3) 0~1.0%
コール酸ナトリウム 0.1%

試薬2-F

緩衝液 pH 8.5
15 コレステロール脱水素酵素 (CDH) 20.0 U/mL
LPL 6.0 U/mL
(*Chromobacterium viscosum* 由来)
コール酸ナトリウム 0.2%

20 実験4のための試薬1-Gと試薬2-G

試薬1-G

緩衝液 pH 7.0
二塩化ヒドラジニウム 100 mmol/L
 β -NAD 6.0 mmol/L
25 ノニオンK-230 (HLB値17.3) 0~1.0%
コール酸ナトリウム 0.1%

試薬 2 - G

緩衝液

pH 8.5

コレステロール脱水素酵素 (CDH)

20.0 U/mL

5 LPL

6.0 U/mL

(Chromobacterium viscosum由来)

コール酸ナトリウム

0.2%

実験 1 についての考察 (図 1)

10 Chromobacterium viscosum由来のLPLの
リポ蛋白画分に対する特異性を調べた結果、HDLおよびVLDL画分
に対して非常に強く作用し、LDL画分に対して弱い反応性を示した。
この酵素を使って、以下の実験を進めた。なお、各試薬中に、6 U/mL
L添加することにした。

15

実験 2 についての考察 (図 2)

ヒドラジンの添加効果を確認した。ヒドラジンの添加は、LPLのH
DL画分に対する特異的反応性を更に強めた。LDL画分に対する反応
性は、殆ど変動が見られなかった。この結果をもとに試薬 1 - D に、
20 00 mmol/Lのヒドラジンを添加した。

実験 3 についての考察 (図 3)

HLB値 17.3の非イオン界面活性剤のノニオン K-230/日本
油脂株式会社を使って、HDL画分に対する添加効果を確認した。非イ
25 オン界面活性剤の添加は、LPLのVLDLに対する反応性を極端にさ
げ、HDL画分に対する特異的反応性を更に強めた。LDL画分に対す
るLPLの反応性も低下させる効果を確認した。この結果をもとに試薬

1-D に、0.6%のノニオンK-230を添加した。

実験4についての考察（図4）

各手段、すなわちノニオンK-230、ヒドラジンおよびLPLを組合せて用いた結果、より完璧なHDL画分の選択的反応系を確立した。

産業上の利用の可能性

- 本発明の手段を適宜選択し単独であるいは組合せて導入した特定リボ蛋白画分中の成分の測定方法では、反応液中に形成される複合体や凝集体による濁りが生じることがなく、目的とする特定のリボ蛋白中コレステロールの測定精度を上昇させることができる。
- 5

- また本発明の測定方法を用いれば、生化学的検査項目を同時に測定してもその測定結果への影響がないため、リボ蛋白中コレステロールの測定と、生化学的検査項目の測定とを同時に行うことが可能となる。また本発明の測定方法は、遠心分離をする必要がなく、試薬分注操作も2段階であるため、汎用されているほとんどの自動分析装置に適用することができ、測定の簡易化を達成できる。
- 10

さらに本発明は、リボ蛋白中のコレステロールのみならず他の脂質成分（中性脂肪、リン脂質等）の測定にも応用可能である。

請求の範囲

1. 血清中の特定リポ蛋白画分中の成分を酵素反応で測定する方法において、特異的に該成分を測定するために、複合体および／または凝集体を形成させることなく、特定リポ蛋白画分中の測定目的の成分に対して優先的に酵素反応を可能にする調整手段を導入することを特徴とする特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。
2. 前記調整手段が、特定リポ蛋白画分中の測定目的の成分が反応液中で酵素反応しやすくなるように反応液のイオン強度を調整する手段である請求の範囲第1項に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。
3. 前記イオン強度の調整が、高比重リポ蛋白（HDL）中の成分を溶液中で酵素反応しやすくするために、反応液のイオン強度を十分な程度に高くすることである請求の範囲第2項に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。
4. 前記調整手段が、酵素の特定リポ蛋白に対する反応特異性を利用して、特定リポ蛋白画分中の成分に対して直接のおよび／または優先的に反応液中で酵素反応を可能とする手段である請求の範囲第1項に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。
5. 前記特定リポ蛋白画分中の成分に対して直接のおよび／または優先的に酵素反応を可能とする手段が、HDL画分に優先的に作用するリポ蛋白リパーゼおよび／またはコレステロールエステラーゼを反応させることである請求の範囲第4項に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。
6. 前記調整手段が、選択された非イオン界面活性剤の特定リポ蛋白に対する反応選択性を利用して、特定リポ蛋白画分中の成分に対して直接のおよび／または優先的に反応液中での酵素反応を可能とする手段である請求の範囲第1項に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定

方法。

7. 前記非イオン界面活性剤としてHDL画分に対して反応選択性をもつHLB値が16以上である非イオン界面活性剤を使い、HDL画分の成分に対して直接のおよび／または優先的に反応液中で酵素反応を可能とする請求の範囲第6項に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。
8. 請求の範囲第5項に記載の測定方法と、第3項および／または第7項に記載の測定方法とを組み合わせる行う請求の範囲第1項に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。
9. 請求の範囲第4項に記載の測定方法と、第2項および／または第6項に記載の測定方法とを組み合わせる行う請求の範囲第1項に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。
10. 第一酵素反応系において、請求の範囲第8項または第9項に記載の測定方法を利用してHDL画分中のコレステロール成分を選択的に酵素反応させて測定または消化し、第二酵素反応系において、請求の範囲第4項に記載の測定方法とHLB値が11～13である非イオン界面活性剤とを利用してLDL画分中のコレステロール成分を酵素反応させる手段を導入することからなるLDL画分中のコレステロールの測定方法である請求の範囲第1項に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。
11. 請求の範囲第10項に記載の測定方法において、第一酵素反応系および第二酵素反応系を、同時にまたは別々に処理することによって超低比重リポ蛋白(VLDL)中のコレステロール成分を残留させ、ついでVLDL画分を分解する手段を導入してVLDL画分中のコレステロール成分を酵素反応させることからなるVLDL画分中のコレステロールの測定方法である請求の範囲第1項に記載の特定リポ蛋白画分中の成分の測定方法。

12. コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素を添加して遊離のコレステロールを消化する工程を加えた、請求の範囲第8～11項のいずれか1項に記載の特定リボ蛋白画分中の成分の測定方法。
13. 反応液のpHが、リボ蛋白が凝集または白濁をおこさない範囲であって、リボ蛋白中の成分を酵素反応させる酵素の至適pHにより選択される、請求の範囲第1～12項のいずれか1項に記載の特定リボ蛋白画分中の成分の測定方法。

図 1

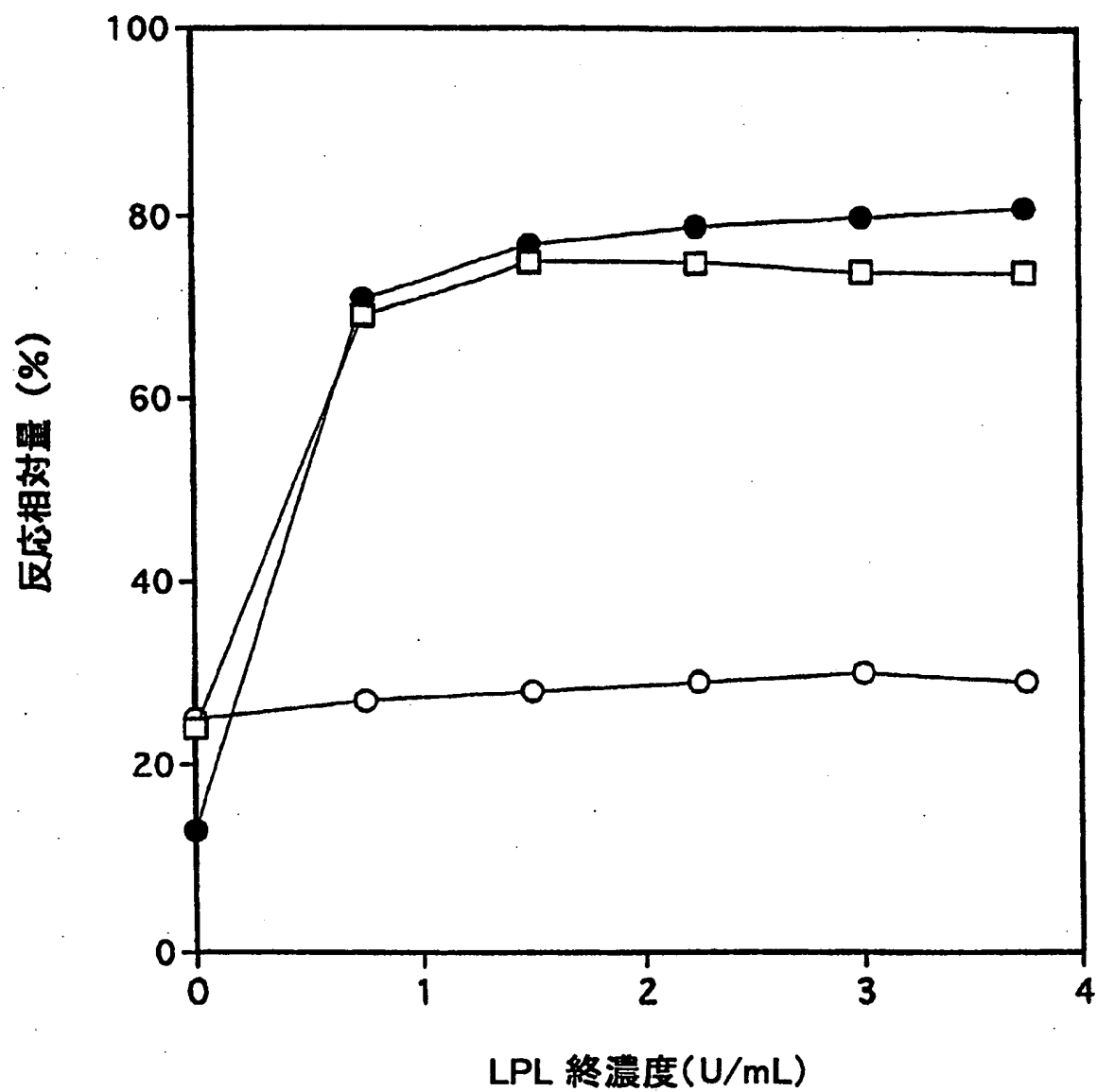


図 2

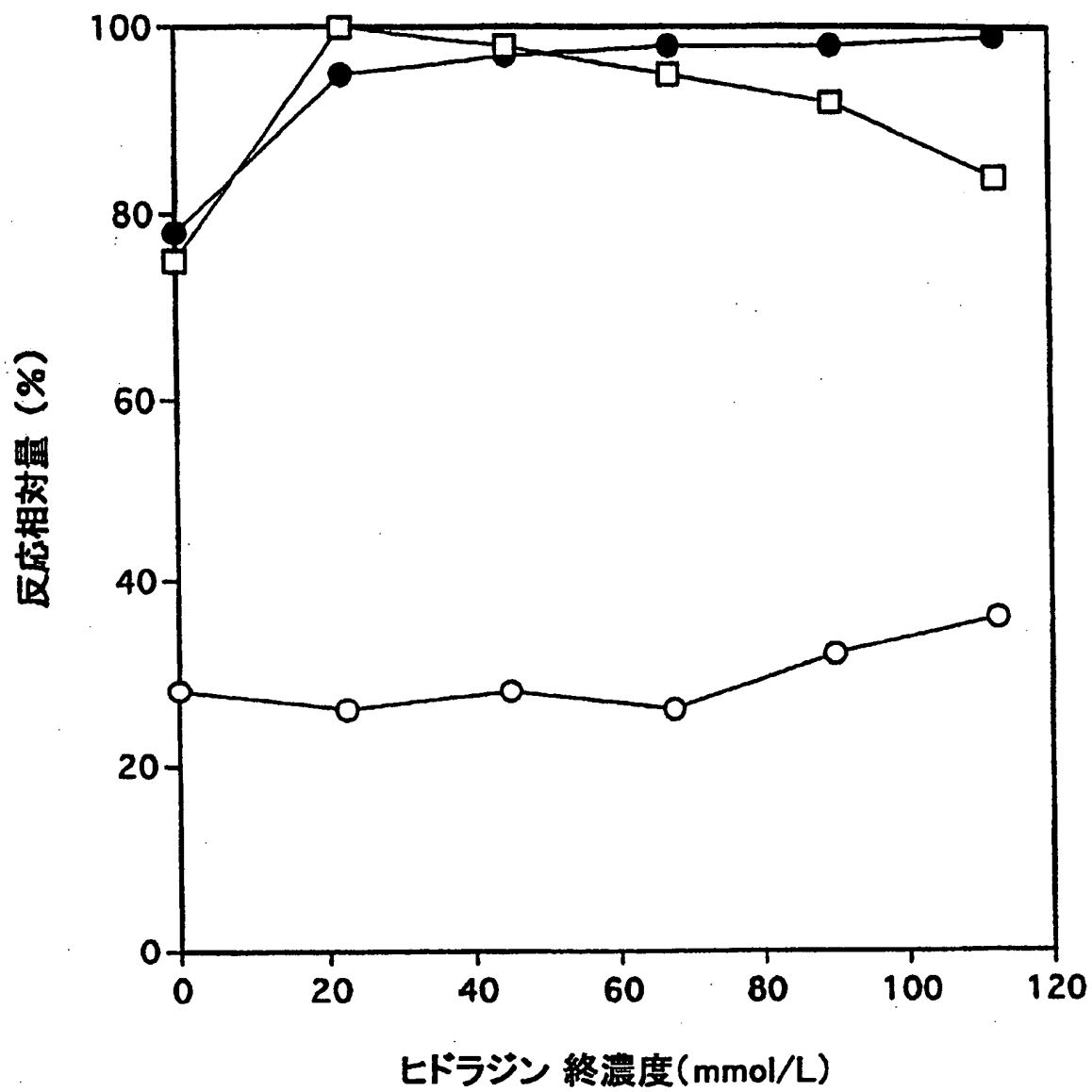


図 3

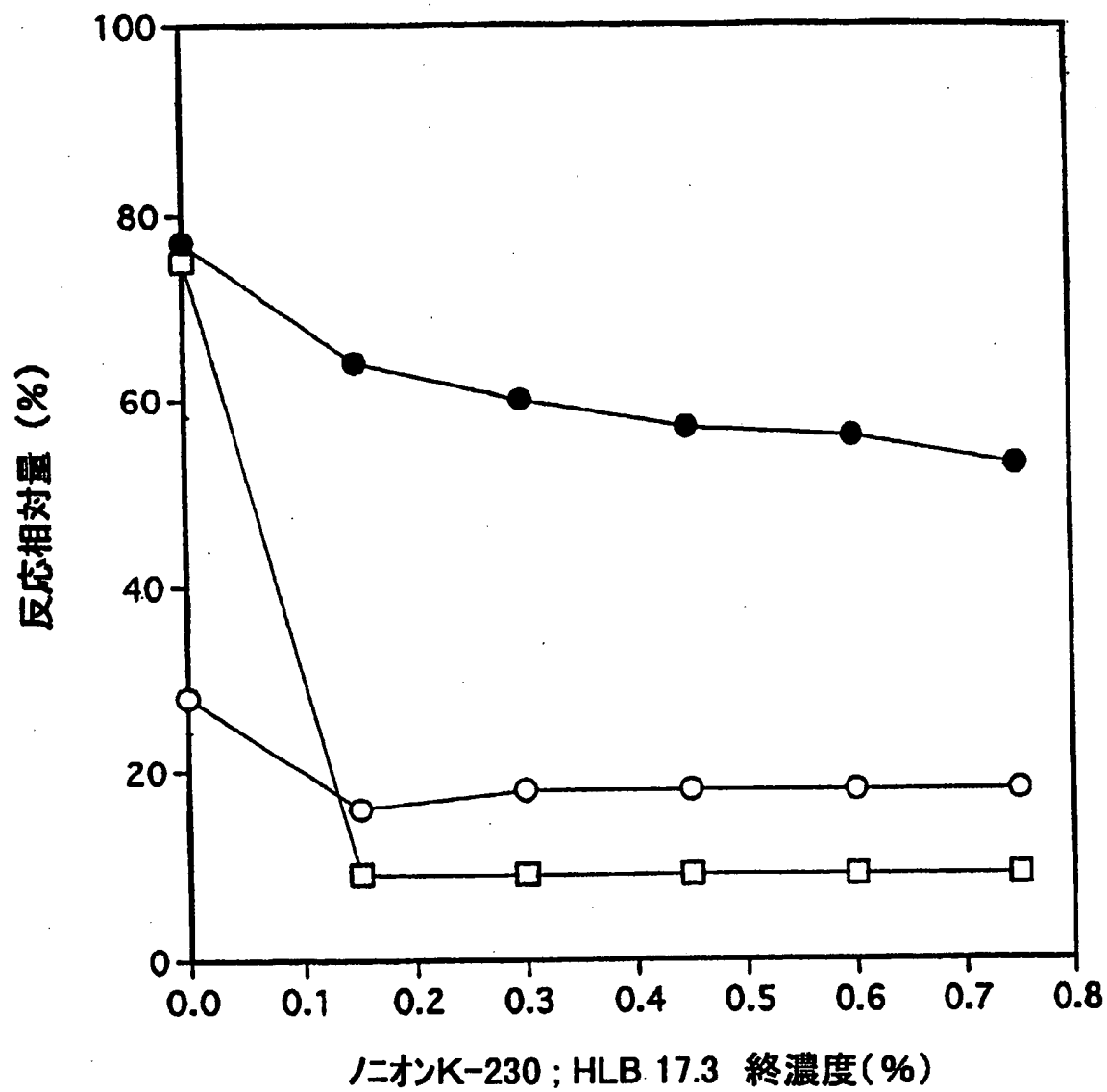
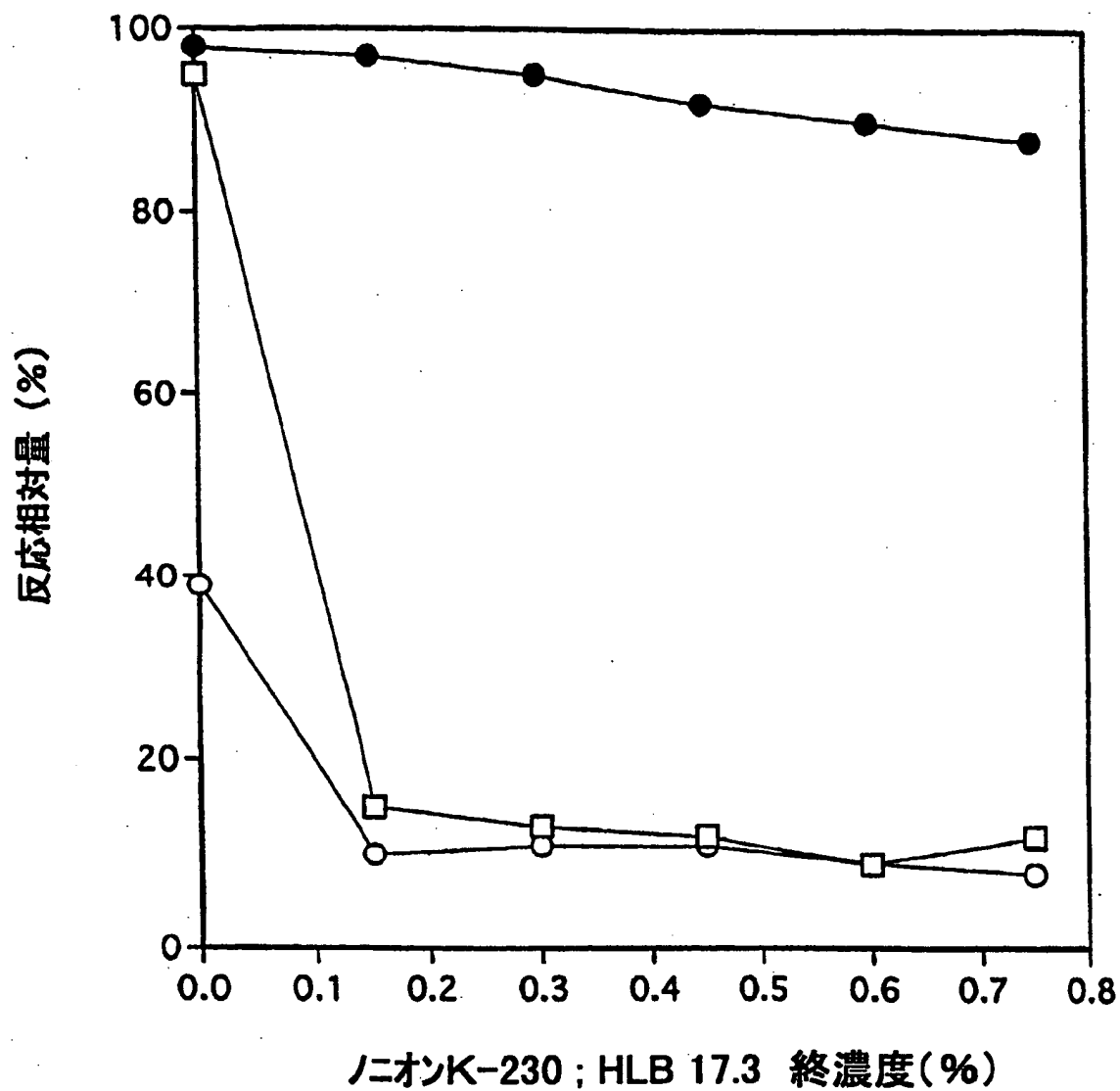


図 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/92, C12Q 1/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/92, C12Q 1/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS, JICST

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-------------|---|--------------------------------|
| PX PY | JP, 11-56395, A (Daiichi Pure Chem. Co., Ltd.), 02 March, 1999 (02.03.99) & WO, 99010526, A & AU, 8750998, A | 1-6, 13 7-12 |
| X Y A | JP, 10-311833, A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 24 November, 1998 (24.11.98) & US, 5814472, A & EP, 878716, A | 1, 2, 4, 6, 13 3, 5 7-12 |
| X Y | JP, 9-299, A (INTERNATIONAL REAGENTS CORP.), 07 January, 1997 (07.01.97) (Family: none) | 1-6, 13 7-12 |
| A | JP, 11-30617, A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 02 February, 1999 (02.02.99) & US, 5814472, A & EP, 878716, A | 1-13 |
| A | JP, 10-84997, A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 07 April, 1998 (07.04.98) & EP, 821239, A & US, 5885788, A | 1-13 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
23 May, 2000 (23.05.00)Date of mailing of the international search report
20.06.00Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01172

| | | |
|--|---|--------------------------------|
| A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ G01N33/92, C12Q 1/44 | | |
| B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ G01N33/92, C12Q 1/44 | | |
| 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2000年 日本国登録実用新案公報 1994-2000年 日本国実用新案登録公報 1996-2000年 | | |
| 国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS, JICST | | |
| C. 関連すると認められる文献 | | |
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| PX PY | JP, 11-56395, A (第一化学薬品株式会社), 2.3月.1999(02.03.99) & WO, 99010526, A & AU, 8750998, A | 1-6, 13 7-12 |
| X Y A | JP, 10-311833, A (和光純薬工業株式会社) 24.11月.1998(24.11.98) & US, 5814472, A & EP, 878716, A | 1, 2, 4, 6, 13 3, 5 7-12 |
| X Y | JP, 9-299, A (国際試薬株式会社) 7.1月.1997 (07.01.97) (ファミリーなし) | 1-6, 13 7-12 |
| <input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列举されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。 | | |
| * 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献 | | |
| 国際調査を完了した日 23.05.00 | 国際調査報告の発送日 20.06.00 | |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JJP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 竹中靖典 電話番号 03-3581-1101 内線 3252 2J 9507 | |

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| A | JP, 11-30617, A (和光純薬工業株式会社) 2. 2月. 1999 (02. 02. 99) & US, 5814472, A & EP, 878716, A | 1-13 |
| A | JP, 10-84997, A (和光純薬工業株式会社) 7. 4月. 1998 (07. 04. 98) & EP, 821239, A & US, 5885788, A | 1-13 |